TP – ETUDE DES ENZYMES

Le but de ce TP est d'étudier un type de protéine particulier, les enzymes. Nous prendrons l'exemple de l'amylase, enzyme présente dans la salive.

- *L'eau iodée (=lugol) permet de tester la présence de polymère de glucose, tel que l'amidon* $(C_6H_{10}O_5)_n$. Il suffit de placer quelques gouttes sur la substance à tester.
- *La liqueur de Fehling (bleue) permet de tester la présence de sucres réducteurs, comme le glucose* $C_6H_{12}O_6$. Il suffit de placer 1à 2 ml de la solution à tester dans un tube à essai, d'y rajouter 1à 2 ml de liqueur de Fehling et de porter à ébullition. Il faut s'arrêter avant les premières bulles.

Attention ! Les tubes doivent TOUJOURS être tournés vers un mur et JAMAIS vers quelqu'un.

A. Mise en évidence des glucides de la mie de pain

1. **Mettez** quelques gouttes d'eau iodée (=lugol) sur de la mie de pain. **Comparez** à un témoin négatif (eau).**Décrivez** la réaction et **concluez**.
2. **Réalisez** la réaction à la liqueur de Fehling à chaud sur de la mie de pain mélangée à de l'eau, comparée à un témoin. **Schématisez** le résultat et **concluez**.

B. Action de la salive sur la mie de pain

Si on laisse une heure de la salive au contact de la mie et si l'on réalise ensuite les tests à l'eau iodée et à la liqueur de Fehling, on obtient les résultats suivants : 1.La coloration de l'eau iodée reste jaune, et 2.Il y a un très abondant précipité rouge brique avec la liqueur de Fehling.

3. Par comparaison avec les résultats obtenus en A, **définissez** le rôle de la salive dans la digestion de la mie de pain.

C. Action de la salive (ou de l'amylase) sur l'empois d'amidon

L'empois d'amidon est obtenu en délayant de l'amidon en poudre dans de l'eau puis en portant l'ensemble à ébullition. On utilisera de l'amylase purifiée (protéine présente dans la salive).

TUBES A REALISER

NB : Comme l'on cherche à comparer les tubes, il est important que les quantités soient identiques d'un tube à l'autre, on remplacera donc les éléments absents par de l'eau distillée. Cette étude n'est pas quantitative, la valeur précise des quantités n'a donc pas beaucoup d'importance (vous pouvez compter un centimètre de hauteur dans le tube au lieu de 1ml). L'amylase, dont on veut étudier l'effet sera ajoutée au dernier moment dans les tubes concernés.

	3-5 ml		1 ml		5 gouttes	Conditions	
	Empois d'amidon	Saccharose	Amylase fraîche	Amylase bouillie	Soude	Température	pH
Tube 1			X			37°C	neutre
Tube 2	X					37°C	neutre
Tube 3	X		X			37°C	neutre
Tube 4	X			X		37°C	neutre
Tube 5	X		X		X	37°C	basique
Tube 6	X		X			0°C	neutre
Tube 7		X	X			37°C	neutre

Tableau de la composition des tubes à réaliser

4. Réalisez les 7 tubes et **laissez**-les reposer pendant 10 minutes

Puis,

- placez quelques gouttes de chaque tube sur la plaque de titration, et **réalisez** le test à l'eau iodée.
- Prélevez une partie de chaque tube et **pratiquez** le test à la liqueur de Fehling.

Notez les résultats dans un tableau (n'indiquez pas seulement + ou – mais ce que cela signifie !)

5. Interprétez les résultats en comparant chacun des tubes 3 à 7 à un témoin.

6. Ecrivez la réaction de dégradation de l'amidon en présence d'amylase.

A. Etude structurale de l'amylase

La structure de certaines enzymes est connue. Par la technique de la cristallographie aux rayons X, les scientifiques ont élaboré des modèles moléculaires de l'enzyme seule ou de l'enzyme avec son substrat.
On cherche à comprendre les modalités de l'action de l'enzyme sur le substrat en étudiant un modèle présentant l'amylase et un petit fragment d'amidon.

Mode d'emploi succinct de RasTop :

- Rotation de la molécule : souris + bouton gauche enfoncé
- Déplacement de la molécule : souris + bouton droit
- Zoom : souris+touche majuscule
- Coloration possible en fonction de l'atome, des chaines…(Menu Atomes / Colorer)
- Les liaisons hydrogènes (faibles) et les ponts dissulfures (liaisons covalentes entre deux Soufre) peuvent être affichés (Menu Liaison, choisir Type Bâtonnets et rayon entre 50 et 250)
- Les boutons sur fond bleu change le mode de représentation des molécules ou des parties sélectionnées (sphères, sphères et bâtonnets, bâtonnets, ruban polypeptidique…)
- A leur droite et sur la ligne inférieure : boutons permettant de sélectionner une partie (un atome, une chaîne,…) des molécules. Pour cela, cliquez sur le bouton puis cliquez sur l'atome que l'on veut sélectionner, et enfin de pas oublier de 'décliquer' le bouton de sélection
- Le cadre inférieur affiche des informations au fur et à mesure des actions.

7. Ouvrez le fichier « amylase complexée avec fragment… » avec le logiciel RasTop. **Affichez** en sphères et **observez** (les oxygènes isolées sont en fait des molécules d'eau car aucun atome d'hydrogène n'est représenté). **Affichez** ensuite en ruban pour observer la structure de la protéine. **Décrivez** la brièvement.
8. Affichez les liaisons hydrogènes. **Dites** où elles sont principalement localisées et **déduisez-**en un rôle possible.
9. Choisissez la représentation en bâtonnets sans les liaisons hydrogène. Dans le cadre 'Propriétés', **choisissez** 'Protéiques' et **sélectionnez** (bouton avec un carré bleu sur un carré blanc). **Sélectionnez** la représentation en sphères (seule la protéine est affectée) puis **colorez** par chaîne. Vous pouvez alors **observer** la localisation du fragment d'amidon (représenté en bâtonnets rouge et gris). **Décrivez** sa position.
10. **Emettez** alors une hypothèse sur le fonctionnement de cette protéine.
11. En reprenant l'ensemble de votre travail, **résumez** comment et dans quelles conditions la salive agit sur l'amidon de la mie de pain.